	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10380.1 – Stanovení obsahu vitamínu A a vitamínu E metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	3

STANOVENÍ OBSAHU VITAMÍNU A A VITAMÍNU E METODOU HPLC

1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení vitamínu A a vitamínu E v krmivech a premixech.

2 Princip

Obsah vitamínu A a E se stanoví po alkalické hydrolyze hydroxidem draselným, následné extrakci na pevné fázi a převedení do cyklohexanu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC na normální fázi.

Pro stanovení vitamínu A se použije UV detekce při 325 nm nebo fluorescenční detekce, excitační vlnová délka $E_x = 325$ nm, emisní vlnová délka $E_m = 480$ nm.

Pro stanovení vitamínu E se použije UV detekce při 292 nm nebo fluorescenční detekce, $E_x = 292$ nm, $E_m = 330$ nm.

Druhou možností stanovení je, že se vzorek převede do metanolu.

Obsah vitamínu A se stanoví metodou HPLC na reverzní fázi s UV detekcí při vlnové délce 325 nm nebo fluorescenční detekcí, excitační vlnová délka $E_x = 325$ nm, emisní vlnová délka $E_m = 480$ nm.


Obsah vitamínu E se stanoví metodou HPLC na reverzní fázi metodou UV detekce při 292 nm nebo fluorescenční detekce při vlnových délkách $E_x = 295$ nm, $E_m = 330$ nm.

Mez stanovitelnosti metody závisí na matici vzorku stejně jako na použitém přístroji.


3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Etanol, absolutní.
- 2 Etanol, denaturovaný 1 % hexanu.
- 3 Cyklohexan, čistota HPLC.
- 4 Hydroxid draselný, KOH, vodný roztok.
Příprava: 500 g hydroxidu draselného se rozpustí v 500 ml vody za stálého míchání a chlazení.
- 5 Kyselina askorbová, 20% vodný roztok.
Příprava: Do 100ml baňky se odváží 20 g kyseliny askorbové, přidá se asi 50 ml vody (15) a kyselina askorbová se rozpustí. Pak se doplní vodou (15) po značku. Roztok se připravuje denně čerstvý.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10380.1 – Stanovení obsahu vitamínu A a vitamínu E metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	3

- 6 Sulfid sodný, např. dekahydrát, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$.
- 7 Sulfid sodný Na_2S , alkalický roztok.
 Příprava: 112 g sulfidu sodného (6) se rozpustí v 1000 ml roztoku hydroxidu draselného (4).
- 8 Butylhydroxytoluen (BHT).
- 9 Vitamín A, standardní látka (např. all-trans-retinol palmitát).
- 10 Vitamín E, standardní látka (např. DL-alfa-tokoferol).
- 11 Mobilní fáze – pro normální fázi.
 Příprava: Smíchá se 985 ml cyklohexanu (3) a 15 ml etanolu (1).
- 12 Základní standardní roztok vitamínu A.
 Příprava: Naváží se tolik standardní látky vitamínu A (9), aby se do práce vzalo 50000 m.j. vitamínu A. Toto množství se zmýdelní a extrahuje podle postupu (5.2 a 5.3) Získá se základní standardní roztok vitamínu A (retinolu) o koncentraci asi 66 m.j./ml.
 Skutečná koncentrace vitamínu A (retinolu) v základním standardním roztoku se zjistí spektrofotometricky. Proměří se jeho absorbance proti cyklohexanu při vlnové délce 325 nm. V cyklohexanu má koncentrace vitamínu A – retinolu 33333 m.j./ml absorbanci 1735 – tedy koncentrace 10 m.j./ml má vykazat absorbanci 0,5205.
 Získaný základní standardní roztok se uchovává v odměrné baňce z tmavého skla v ledničce.
- 13 Základní standardní roztok vitamínu E.
 Příprava: Do 100ml odměrné baňky se naváží přesně cca 50 mg DL alfa-tokoferolu (10) a doplní se po značku cyklohexanem (3). Tento základní standardní roztok má koncentraci cca 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
 Skutečnou koncentraci vitamínu E v zásobním roztoku lze kontrolovat spektrofotometrickým měřením při vlnové délce 292 nm proti cyklohexanu (3). V cyklohexanu má koncentrace vitamínu E 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ absorbanci 0,420.
 Získaný základní standardní roztok se uchovává v odměrné baňce z tmavého skla v ledničce.
 V případě použití standardu ve formě acetátu se standard zmýdelní.
- 14 Pracovní standardní roztoky vitamínů A a E.
 Příprava: Pracovní standardní roztoky se získají ředěním základního standardního roztoku (12 nebo 13) tak, aby z nich připravené kalibrační koncentrace pro nástřík do HPLC systému dosahovaly přibližně hodnot, které odpovídají koncentracím vzniklým přípravou vzorku k analýze.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10380.1 – Stanovení obsahu vitamínu A a vitamínu E metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	3

Doporučené koncentrace pracovních standardních roztoků:

Vitamín A (0,045 – 10) m.j./ml, (max.15 m.j./ml),

Vitamín E (1,5 – 50) µg/ml, (max. 80 µg/ml).

Při současném stanovení vitamínu A a E v jednom nástríku je možno připravit směsný pracovní standardní roztok.

- 15 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 16 Metanol, HPLC grade.
- 17 Mobilní fáze – pro reverzní fázi.
Příprava: Smíchá se 980 ml metanolu (16) a 20 ml vody (15).

Poznámky

- 1 *Kyselina askorbová a BHT se přidávají jako antioxidanty a Na₂S pro vázání těžkých kovů.*
- 2 *Základní standardní roztok vitamínu A není třeba vždy připravovat čerstvý, protože "slábnutí" standardu lze spektrofotometricky sledovat. S aktualizovanou hodnotou se počítá ve výpočtu.*

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV a/nebo FF detekcí.
- 2 Rotační míchačka (např. Wagnerovo kolo) nebo vodní lázeň s mícháním.
- 3 Kolonky SPE, např. EXTRELUT (MERCK).
- 4 Laboratorní odstředivka.
- 5 Ultrazvuková lázeň.


Poznámky

- 3 *UV detektor a FF detektor jsou zapojeny v sérii, což umožňuje stanovení vitamínu A i vitamínu E na jeden nástrík.*

5 Postup

5.1 Příprava vzorku

Podle předpokládaného obsahu vitamínu A se naváží 5 g až 30 g dobře rozemletého a zhomogenizovaného zkušební vzorku. Vzorek se mele bezprostředně před stanovením tak, aby nedošlo k zahřátí vzorku.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10380.1 – Stanovení obsahu vitamínu A a vitamínu E metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	3

5.2 Zmýdelnění

K naváženému vzorku ve zmýdelňovací baňce se přidá 130 ml etanolu (1), 30 ml alkalického roztoku sulfidu sodného (7), 1 g kyseliny askorbové (5) a na špičku nože BHT (8).

Zmýdelňování probíhá za studena přes noc (nejméně 12 h) při laboratorní teplotě v uzavřených baňkách upevněných v rotační míchačce (např. Wagnerovo kolo). Saponifikace při laboratorní teplotě poskytuje nižší rozptyl výsledků.

Lze použít také zmýdelňování za tepla, které probíhá ve vodní lázni s mícháním pod zpětným chladičem v atmosféře dusíku při teplotě 80 °C po dobu 30 min. Po uplynutí této doby se baňka vyjme z vodní lázně a nechá se pod zpětným chladičem ochladit na laboratorní teplotu.

V případě potřeby se vychladlý obsah baňky zfiltruje přes skládaný filtr, prvních 10 ml se nepoužije.

5.3 Extrakce

Odpipetuje se 40 ml filtrátu (z bodu 5.2) a doplní se roztokem kyseliny askorbové (5) na 50 ml v odměrné baňce. Po řádném promíchání eventuálně vzniklé emulze se pipetuje 15 ml na SPE kolonku. Po 15 min se zakotvená organická fáze vymyje 70 ml cyklohexanu (3). Eluát se jímá do 50ml odměrné baňky (poznámka 4) a doplní se po značku cyklohexanem (3) (poznámka 5). Takto připravený vzorek se přímo dávkuje do HPLC systému s normální fází.


Druhou možností je, že se alikvotní podíl vzorku vitamínu A a E v cyklohexanu odpaří pod proudem dusíku do sucha, rozpustí v alikvotním podílu metanolu (16) v ultrazvukové lázni (5) a poté se dávkuje na kolonu s reverzní fází. Před nástřikem na kolonu je vhodné vzorek odstředit (3 – 5) min při 10 000 ot./min na laboratorní odstředivce.

Poznámky

- 4 *Velikost 50ml odměrné baňky pro jímání eluátu je dostatečná. Část cyklohexanu se odpaří a část pojme EXTRELUT (3), kterým cyklohexan protéká.*
- 5 *Pokud se ve vzorku očekává vysoký obsah vitamínů (premixy DL), je nezbytné ověřit, že vitamíny byly z SPE kolonky zcela vymyty. Kolonka SPE se promyje dalším objemem cyklohexanu a eluát se proměří na přítomnost vitamínů na HPLC. Při pozitivním nálezů je třeba na extrakci z SPE kolony použít takové množství cyklohexanu, které zajistí eluci veškerých vitamínů z SPE kolony.*

5.4 Chromatografické stanovení

Ze základních standardních roztoků (12, 13) se naředěním asi na (70; 90; 110; 130) % vypočtené nástřikové koncentrace vzorku sestrojí čtyřbodový kalibrační graf, kde plocha píků je úměrná koncentraci standardů.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10380.1 – Stanovení obsahu vitamínu A a vitamínu E metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	3

Kalibrační roztoky i extrakty zkušebních vzorků se měří za separačních podmínek chromatografického systému, které uvádějí tabulky 1 až 4. Podmínky jsou doporučené, mohou být použity jiné podmínky za předpokladu, že dávají rovnocenné výsledky.

Tabulka 1. Požadované parametry pro separaci na analytické koloně s normální fází.


Kolona	Silica 5 μ m; (3,9 \times 150) mm nebo obdobná
Teplota kolony	28 °C
Průtok mobilní fáze	0,7 ml/min
Objem nástřiku	Krmné směsi 30 μ l; premix 5 μ l
Retenční čas	3,7 min – vitamín A; 1,6 min – vitamín E

Tabulka 2. Detekce pro separaci na analytické koloně s normální fází.

	UV	FF exc.	FF em.
Vitamín A	325 nm	325 nm	480 nm
Vitamín E	292 nm	292 nm	330 nm

Tabulka 3. Požadované parametry pro separaci na analytické koloně s reverzní fází.

Kolona	Zorbax Eclipse XDB C 8, 5 μ m; (4,6 \times 150) mm nebo obdobná
Teplota kolony	28 °C
Průtok mobilní fáze	0,8 ml/min
Objem nástřiku	Krmné směsi 30 μ l; premix 5 μ l
Retenční čas	2,5 min – vitamín A; 4,5 min – vitamín E

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10380.1 – Stanovení obsahu vitamínu A a vitamínu E metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	3

Tabulka 4. Detekce pro separaci na analytické koloně s reverzní fází.

	UV	FF exc.	FF em.
Vitamín A	325 nm	325 nm	475 nm
Vitamín E	292 nm	295 nm	330 nm

Poznámky

- 6 Všechny úkony je nutné vykonávat za omezeného přístupu světla.
- 7 Jestliže se při deklarované hodnotě (1000 – 4 000) m.j./kg vitamínu A paralelní výsledky liší navzájem o více než 20 %, doporučuje se zvýšit navážku na 60 g vzorku a zdvojnásobit množství všech použitých chemikálií při zmydelňování vzorku.
- Doporučené navážky vzorku pro stanovení vitamínu A uvádí tabulka 5.

Tabulka 5. Doporučené navážky vzorku.

Deklarované množství vitamínu A (m.j./kg)	Navážka vzorku (g)
4 000 – 50 000	30
50 000 – 200 000	20
200 000 – 1 000 000	10
1000 000 – 5 000 000	5

Předpokládaná nástřiková koncentrace vitamínu A (E) ve vzorku se vypočte podle vztahu


$$C = 1,5 \times 10^{-3} \times D \times m \quad (\text{vztah 1})$$

C předpokládaná nástřiková koncentrace; vit A (m.j./ml); vit E (μg/ml),

D deklarovaná hodnota; vit A (m.j./g); vit E (μg/g),

m hmotnost navážky zkušební vzorku (g).

Uvedený vztah platí pouze pro tento pracovní postup.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10380.1 – Stanovení obsahu vitamínu A a vitamínu E metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	3

Další příklad volby navážky a výpočtu nástřikových koncentrací pro

a) Krmné směsi

Vzorek má deklarovanou hodnotu 5 000 m.j./kg vitamínu A, 30 mg/kg vitamínu E. Navážka vzorku 30 g. Dosazením do vztahu 1 se získá hodnota nástřikové koncentrace $C = 0,225$ m.j./ml pro vitamín A, hodnota nástřikové koncentrace $C = 1,35$ µg/ml pro vitamín E.

b) Premixy

Vzorek má deklarovanou hodnotu 1400000 m.j./kg vitamínu A, 3 000 mg/kg vitamínu E. Navážka vzorku 5 g. Dosazením do vztahu 1, se získá hodnota nástřikové koncentrace $C = 10,5$ m.j./ml pro vitamín A, hodnota nástřikové koncentrace $C = 22,5$ µg/ml pro vitamín E.

- 8 *BHT (8) má velmi podobné podmínky FF detekce jako α -tokoferol ($E_x = 283$ nm, $E_m = 310$ nm). Za optimálních podmínek chromatografie (klíčová je především kvalita kolony) je pík BHT separován, retenční čas je nižší než u vitamínu E. V případě špatné separace může nastat stav, kdy retenční časy BHT a vitamínu E jsou shodné. V takovém případě získaný výsledek není správný.*

6 Výpočet

Obsah vitamínu A (m.j./kg) (poznámka 9) a vitamínu E (mg/kg) (poznámky 10 a 11) ve zkoušeném vzorku se vypočte podle vztahu

$$X = \frac{666,667 \times C_1}{m}$$

- C_1 koncentrace vitamínu A (m.j./l), resp. koncentrace vitamínu E (µg/ml), zjištěná z kalibračního grafu metodou vnějšího standardu,
 m hmotnost navážky zkoušeného vzorku (g).

Poznámky

- 9 *Výsledek stanovení obsahu vitamínu A je třeba interpretovat jako obsah all-trans a cis izomeru.*
- 10 *Výsledek stanovení obsahu vitamínu E je třeba interpretovat jako celkový obsah alfa tokoferolu. Vedle této modifikace se ještě může vitamín E vyskytovat v surovinách v podobě beta, gama i delta tokoferolu, nebo i alfa, beta, gama, delta tokotrienolu. Tyto nativní obsahy jsou však velmi nízké a jejich zastoupení je v různých materiálech různé. Z teoretického hlediska však je nutno na tento fakt upozornit.*
- 11 *Výsledek stanovení obsahu vitamínu E je možné interpretovat také jako alfa tokoferol acetát, kde 1 mg alfa tokoferol acetátu odpovídá 0,91 mg alfa tokoferolu (vitamin E).*